



**University of
Zurich**^{UZH}

**Zurich Open Repository and
Archive**

University of Zurich
University Library
Strickhofstrasse 39
CH-8057 Zurich
www.zora.uzh.ch

Year: 2019

Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus Nachweis beim Europäischen Igel (*Erinaceus europaeus*)

Schönbächler, K ; Hatt, Jean-Michel ; Silaghi, Cornelia ; Merz, N ; Fraefel, C ; Bachofen, Claudia

Abstract: European hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) have a high exposure to various ticks, which could transmit pathogens with direct health significance for the host and may have zoonotic potential. Tick-borne meningoencephalitis (FSME) is an important tick-borne disease in Switzerland, caused by the tick-borne encephalitis virus. About its occurrence in the European hedgehog population is little known. The present study examined various organs, blood and ticks of 65 European hedgehogs to obtain data of FSME virus presence in this species in Switzerland. Real-time RT-PCR from the lungs, liver, spleen and kidney of 56 hedgehogs and of 114 infesting ticks (*Ixodes hexagonus* or *Ixodes ricinus*) were used for the detection of viral RNA. In addition, 19 blood samples were tested for antibodies against FSME by ELISA. FSME virus antibodies were detected for the first time in the serum of a European hedgehog. Lung and spleen tissue samples of the same animal tested also weak virus positive on RT-PCR. Clinically, the hedgehog showed neurological symptoms, although these symptoms could have originated from an other diseases. No viral RNA was detected in any of the ticks. This study could not confirm if the meningoencephalitis in the hedgehog was triggered by the FSME viral infection. Nevertheless, the simultaneous detection of antibodies and virus RNA in the same animal makes the European hedgehog a competent host of the tick-borne encephalitis virus and leads to the assumption that this species can act as a reservoir.

DOI: <https://doi.org/10.17236/sat00191>

Other titles: Confirmation of Tick-borne encephalitis virus in an European hedgehog (*Erinaceus europaeus*)

Posted at the Zurich Open Repository and Archive, University of Zurich

ZORA URL: <https://doi.org/10.5167/uzh-160829>

Journal Article

Published Version

Originally published at:

Schönbächler, K; Hatt, Jean-Michel; Silaghi, Cornelia; Merz, N; Fraefel, C; Bachofen, Claudia (2019).

Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus Nachweis beim Europäischen Igel (*Erinaceus europaeus*). Schweizer Archiv für Tierheilkunde, 161(1):23-31.

DOI: <https://doi.org/10.17236/sat00191>

Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus Nachweis beim Europäischen Igel (*Erinaceus europaeus*)

K. Schönbachler, J.-M. Hatt, C. Silaghi*, N. Merz, C. Fraefel, C. Bachofen

Virologisches Institut, Klinik für Zoo- Heim- und Wildtiere, Nationales Zentrum für Vektorentomologie/Institut für Parasitologie, Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich

Zusammenfassung

Aufgrund des hohen Zeckenbefalls bei wildlebenden Europäischen Igeln (*Erinaceus europaeus*) haben diese Tiere eine starke Exposition gegenüber diversen, durch Zecken übertragenen Pathogenen, die neben der direkten gesundheitlichen Bedeutung für den Wirt auch zoonotisches Potential aufweisen können. Die Frühsommer-Meningoenzephalitis ist in der Schweiz eine wichtige durch Zecken übertragene Krankheit, die durch das Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus verursacht wird. Über dessen Vorkommen beim Europäischen Igel ist bisher wenig bekannt. Mit der Untersuchung von Organen, Blut und Zecken von 65 Europäischen Igeln sollte daher erstmalig eine Aussage über die Präsenz des Virus bei dieser Tierart in der Schweiz gemacht werden. Der Nachweis viraler RNA erfolgte mittels real-time RT-PCR aus Lunge, Leber, Milz und Niere von 56 Igeln sowie aus gesamthaft 114 infestierenden Zecken, die entweder der Art *Ixodes hexagonus* oder *Ixodes ricinus* angehörten. Zusätzlich wurden 19 Blutproben mittels ELISA auf Antikörper gegen das Virus getestet. In der vorliegenden Studie konnten erstmals Antikörper gegen das Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus im Blutserum eines Europäischen Igels nachgewiesen werden. Die Lungen- und Milzproben des gleichen Tieres waren zudem schwach Virus-positiv. Derselbe Igel zeigte neurologische Symptome, die allerdings auch mit anderen Krankheiten einhergehen können. In keiner der Zecken wurde virale RNA nachgewiesen. Die Möglichkeit einer durch die Virusinfektion ausgelösten Enzephalitis im Igel kann mit dieser Studie weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Der gleichzeitige Nachweis von Antikörpern und Virus-RNA im selben Tier macht den Europäischen Igel nicht nur zum kompetenten Wirt des Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus sondern gibt auch Anlass zur Annahme, dass diese Art als Reservoir fungieren kann.

Schlüsselwörter: Antikörper, Flavivirus, *Ixodes* spp., Reservoirwirt, Schweiz, Wirt

Confirmation of Tick-borne encephalitis virus in an European hedgehog (*Erinaceus europaeus*)

European hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) have a high exposure to various ticks, which could transmit pathogens with direct health significance for the host and may have zoonotic potential. Tick-borne meningoencephalitis (FSME) is an important tick-borne disease in Switzerland, caused by the tick-borne encephalitis virus. About its occurrence in the European hedgehog population is little known. The present study examined various organs, blood and ticks of 65 European hedgehogs to obtain data of FSME virus presence in this species in Switzerland. Real-time RT-PCR from the lungs, liver, spleen and kidney of 56 hedgehogs and of 114 infesting ticks (*Ixodes hexagonus* or *Ixodes ricinus*) were used for the detection of viral RNA. In addition, 19 blood samples were tested for antibodies against FSME by ELISA. FSME virus antibodies were detected for the first time in the serum of a European hedgehog. Lung and spleen tissue samples of the same animal tested also weak virus positive on RT-PCR. Clinically, the hedgehog showed neurological symptoms, although these symptoms could have originated from an other diseases. No viral RNA was detected in any of the ticks. This study could not confirm if the meningoencephalitis in the hedgehog was triggered by the FSME viral infection. Nevertheless, the simultaneous detection of antibodies and virus RNA in the same animal makes the European hedgehog a competent host of the tick-borne encephalitis virus and leads to the assumption that this species can act as a reservoir.

Keywords: Antibody, Flavivirus, *Ixodes* spp., Reservoir host, Switzerland, host

<https://doi.org/10.17236/sat00191>

Eingereicht: 24.06.2018
Angenommen: 03.12.2018

* aktuelle Adresse: Institut für Infektionsmedizin, Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald Insel Riems, Deutschland

Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus Nachweis beim Europäischen Igel (*Erinaceus europaeus*)

K. Schönbachler et al.

Einleitung

Im Jahre 2017 wurden in der Schweiz und im Fürstentum Liechtenstein 272 humane Fälle von Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) gemeldet. Damit verzeichnete das Bundesamt für Gesundheit laut aktuellen Hochrechnungen im letzten Jahr die höchste FSME-Inzidenz der letzten 10 Jahre mit 3.22 pro 100'000 Einwohner²⁷. Die auch als Zeckenenzephalitis bekannte Zoonose wird von einem behüllten, einzelsträngigen RNA-Virus aus der Familie der Flaviviren hervorgerufen, betrifft das zentrale Nervensystem und wird hauptsächlich durch Zeckenstiche übertragen. Die wichtigste Vektorrolle des europäischen Virus-Subtyps spielt der „Gemeine Holzbock“ (*Ixodes ricinus*)^{1,18}. Aber auch in der „Igelzecke“ (*Ixodes hexagonus*) konnte das FSME-Virus (FSMEV) wiederholt nachgewiesen werden^{10,13}. Durch transstadiale und teilweise transovariable Übertragung wird das Virus innerhalb der Zeckenpopulationen weitergegeben und macht aus infizierten Zecken lebenslange Virusträger¹. Laut einer Studie von Harrison und Bennett (2012) fördert die Anhäufung vieler Zecken auf einem Wirt die Infektion mit dem FSMEV⁸. Zeckenübertragene Pathogene können durch das sogenannte Co-Feeding unabhängig von einer Virämie des Wirtes von Zecke zu Zecke über migrierende Leukozyten übertragen werden²⁴.

Als wichtige Reservoirs des FSMEV unter den Säugetieren werden Insektivoren wie Igel (*Erinaceidae*), Spitzmäuse (*Soricidae*) und Maulwürfe (*Talpidae*) sowie bestimmte Nager (u.a. die Gelbhalsmaus *Apodemus flavicollis*, die Zwergmaus *Micromys minutus* und der Siebenschläfer *Glis glis*) beschrieben¹⁸. Über den europäischen Igel (*Erinaceus europaeus*) im Speziellen liegen bisher nur wenige Studien im Zusammenhang mit dem FSMEV vor. Der einzige direkte Virusnachweis von einem natürlich infizierten, europäischen Igel gelang bisher lediglich Skuballa (2011), in dessen Dissertation gesamthaft 271 europäische Igel auf das FSMEV untersucht wurden. Serologisch konnten in besagter Studie in 90 Blutseren von europäischen Igeln keine Antikörper gegen FSMEV festgestellt werden³⁰. In einer anderen Studie von Labuda und Randolph (1999) wurden zwei europäischen Igeln artifiziell mit FSMEV infizierte *I. ricinus*-Zecken angesetzt und bei keinem der Igel konnte das FSMEV im Blut, in den Lymphknoten oder der Niere nachgewiesen werden. Interessant dabei ist, dass sich aber dennoch wenige Zecken über Co-Feeding auf diesen Igeln mit dem Virus infizieren konnten¹⁵.

Über den nördlichen Weissbrustigel (*Erinaceus roumanicus*) hingegen gibt es mehrere Untersuchungen bezüglich des FSMEV: In der Studie von Radda A. (1973) wird dem nördlichen Weissbrustigel aufgrund seiner starken Zeckenbürde und seinem Virämiopotential eine Bedeu-

tung als Reservoirwirt zugeschrieben²². Laut Nosek und Grulich (1967) sind nördliche Weissbrustigel und andere Winterschläfer besonders wichtig für die Viruszirkulation, da das FSMEV während der Hibernation persistieren kann und das Tier kurz vor dem Winterschlaf oder an dessen Ende intensive und lang anhaltende Virämien ausbilden kann. Zusätzlich besteht die Möglichkeit einer alimentären Infektion des Igels über die Aufnahme von kleinen Säugetieren, die als Virusreservoir fungieren¹².

Da Zecken und Igel oft gemeinsame Habitate besiedeln und die Igel wiederum vor allem im urbanen und sub-urbanen Gebiet ihren Lebensraum mit Menschen teilen, kann postuliert werden, dass Menschen über den Igel mit dem FSMEV und anderen Zecken übertragenen Pathogenen in Kontakt kommen können. Wie oben beschrieben, wurden bisher nur wenige Daten zur Viruspräsenz im europäischen Igel publiziert. Ebenfalls ist nicht bekannt, ob das Virus im Igel eine Krankheit auslösen kann.

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, Informationen zur Bedeutung des europäischen Igels als Wirt und Reservoir des FSMEV zu gewinnen. Zusätzlich sollten Methoden getestet werden, mit welchen das Virus bei dieser Tierart, sowie seinen infestierenden Zecken, nachgewiesen werden kann. Damit soll eine Aussage über die Präsenz des FSMEV im europäischen Igel und seinen Zecken und somit auch über eine allfällige Ansteckungsgefahr für die Menschen in seinem Umfeld gemacht werden können.

Tiere, Material und Methoden

Im Zeitraum vom Mai 2015 bis Juni 2016 wurden ausgewählte Organe (Lunge, Leber, Milz und Niere), Blut und Zecken von insgesamt 65 wildlebenden, europäischen Igeln (*E. europaeus*) gesammelt. Sämtliche Tiere wurden an der Klinik für Zoo-, Heim- und Wildtiere der Universität Zürich vorgestellt, untersucht und je nach Befund behandelt oder euthanasiert. In der Untersuchung wurde das Geschlecht bestimmt und das Körpergewicht ermittelt. Tiere über 500 g Körpergewicht wurden als adult, Tiere darunter als juvenil eingestuft. Des Weiteren wurden der Fundort sowie das Fund- und Eintrittsdatum der Igel registriert. Die untersuchten Igel stammten fast ausschliesslich aus dem Kanton Zürich.

Blut wurde entweder an der *Vena saphena* unter Inhalationsanästhesie im Rahmen der Untersuchung oder bei der Euthanasie direkt aus dem Herzen entnommen und daraus EDTA-Plasma oder Serum gewonnen. Als Gewebeproben wurden am toten Tier Lunge, Leber, Milz und Nieren entnommen. Sofern vorhanden, wurden pro Tier

eine bis fünf Zecken gesammelt. Sämtliche Proben wurden bis zur Untersuchung bei -20°C aufbewahrt.

Die Plasma- und Serumproben der Igel wurden mit dem kommerziellen Immunozytm FSME IgG-All Species-Testkits (PROGEN Biotechnik AG, Heidelberg, Deutschland) getestet. Gemessen wurde die zur Antikörperkonzentration proportionale Lichtabsorption bei 450 nm Wellenlänge mit dem ELISA Reader Sunrise (Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz) oder Infinite (Tecan). Für die Bestimmung der absoluten IgG-Konzentration im Serum (ausgedrückt in Vienna Units (VIEU) pro ml) wurde eine Standardkurve mit 5 Kalibratoren aus lyophilisiertem Humanserum (Bestandteil des Tests) und das Onlineprogramm „elisaanalysis“ (www.elisaanalysis.com) verwendet. Zusätzlich zu den dem Test beiliegenden Kontrollen wurden ein positives und ein negatives Kaninchenserum (Virologisches Institut, Universität Zürich, Zürich, Schweiz) als externe Kontrollen eingesetzt. Die Durchführung des ELISAs sowie die Auswertung erfolgten nach Herstellerangaben. Alle Seren wurden im Doppelansatz untersucht und der Mittelwert zur Bestimmung der VIEU/ml verwendet.

Zur morphologischen Identifizierung der Zecken wurden diese zur besseren Fixation auf einen Objektträger mit FIMO® soft Modelliermasse (STAEDTLER Mars, Nürnberg, Deutschland) gelegt und unter einer Stereolupe untersucht. Es erfolgte eine erste Einteilung in die verschiedenen Stadien und anschliessend wurden die gesammelten Nymphen und Imago mittels zweier Schlüssel morphologisch in die verschiedenen *Ixodes*-Arten eingeteilt^{7,9}.

Es wurden 30 mg Organmaterial homogenisiert. Dazu wurde das Organmaterial in ein Safe Lock Eppendorf Röhrchen (Vaudaux-Eppendorf AG, Schönenbuch/Basel, Schweiz) mit 600 µl RLT Puffer aus dem RNeasy Mini Kit (Qiagen AG, Hombrechtikon, Schweiz) mit 1% β -Mercapto-Ethanol und einer 5 mm Edelstahl-Kugel (Qiagen) überführt. Die Homogenisierung erfolgte im TissueLyser II (Qiagen) während 1 min bei 20 Hz. Anschliessend wurden die Röhrchen drei Minuten lang bei $15'000 \times g$ zentrifugiert und es wurde mit dem Überstand weitergearbeitet. Die Zecken wurden analog homogenisiert, jedoch nur mit 500 µl Puffer, da durch die meist vollgesogenen Zecken das Gesamtvolumen erhöht war. Die RNA-Extraktion mit dem RNeasy Mini Kit erfolgte gemäss Herstellerangaben. Als Extraktions-Kontrolle wurde allen Homogenaten 10 µl der internen Kontrolle STI87-rec des AmpliSens TBE-FRT PCR-Kits (Ecoli s.r.o., Bratislava, Slowakei) beigelegt. Die positive Kontrolle aus dem Kit (TBE-rec), sowie ein Röhrchen ohne RNA als negative Kontrolle wurden bei jeder Extraktion mitgeführt. Die Lagerung der eluierten RNA erfolgte bei -80°C . Die im Einfachansatz extrahierte

RNA wurde mit den im AmpliSens TBE-FRT PCR Kit enthaltenen RT-PCR Reagenzien nach Herstellerangaben gemischt. Der Nachweis der viralen RNA sowie der internen Kontrolle erfolgte im QuantStudio 7 Flex TaqMan Gerät (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Die Datenanalyse erfolgte mit dem Programm QuantStudio 7 Flex (QS7) (Thermo Fisher Scientific, Reinach, Schweiz) unter Berücksichtigung der Hersteller-Guidelines des Kits.

Bei positiven Proben wurde erneut RNA extrahiert und analysiert. Zur Überprüfung und Sequenzierung positiver Proben kam zusätzlich eine verschachtelte (nested) RT-PCR mit Primern innerhalb des NS5-Gens des FSMEV-Genoms zur Anwendung²¹.

Zur zusätzlichen Verifikation positiver Nachweise wurde zudem Next Generation Sequencing (NGS) durchgeführt. Dies wurde mit dem Protokoll von Kubacki *et al.* (2017) an gepooltem Lungen- und Milzgewebe gemacht¹⁴. Dabei wurden 25 mg Lungengewebe und 25 mg Milz gemeinsam homogenisiert und durch Filtration und Nuklease-Behandlung relativ für Viruspartikel angereichert. Der Extraktion der Gesamtnukleinsäuren folgten die reverse Transkription, die Zweitstrangsynthese und die sequenzunabhängige Einzelprimer-Amplifikation. Aus der DNA wurde unter Verwendung des NEBnext ultra II-Kits für Illumina (Biolabs, New England, USA) eine NGS-library hergestellt, mit Barcodes versehen und zusammen mit anderen Proben auf einer Illumina NextSeq-Maschine in einem gepaarten high-output Lauf sequenziert. Nach der Qualitätskontrolle und dem Trimming der Reads wurde eine Referenz-basiertes Alignment unter Verwendung des Softwarepakets SeqMan NGen (DNASTar) und der viralen NCBI RefSeq Virus-Datenbank durchgeführt. Mithilfe des SeqMan Pro Programms des DNASTar-Pakets wurden die Alignments visualisiert und kontrolliert. Contigs wurden mit dem Online-BLAST-Service von NCBI auf Ähnlichkeiten zu publizierten Sequenzen geprüft.

Um bei Igel mit neurologischen Anzeichen eine weitere mögliche Pathogenese für verdächtige Symptome auszuschliessen, die auf eine klinische FSME hindeuten könnten, wurden Organproben von neurologischen Igel der vorliegenden Studie zudem nach Japan in die Azabu University geschickt. Dort wurden sie nach dem Protokoll von Madarame *et al.* (2014) auf ein der Familie Paramyxoviridae angehöriges Mäusepneumonienvirus (pneumonia virus of mice) getestet, das nachweislich das „wobbly hedgehog syndrome“ in Igel auslösen kann¹⁶.

Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus Nachweis beim Europäischen Igel (*Erinaceus europaeus*)

K. Schönbachler et al.

Resultate

Bei den insgesamt 65 untersuchten Igeln handelte es sich um 49 euthanasierte, neun verstorbene und sieben behandelte Tiere. Von diesen Tieren wurden 224 Organproben von 56 Igeln, 19 Serumproben und 114 Zecken von 34 Igeln analysiert. Die Resultate sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Von den gesamthaft 19 untersuchten Serum- und Plasmaproben wurde eine Serumprobe positiv auf FSMEV-spezifische Antikörper getestet. Die Anti-FSMEV IgG-Konzentration war mit 218.57 VIEU/ml, beziehungsweise 245.22 VIEU/ml im zweiten Ansatz klar über dem cut-off von 126 VIEU/ml. Der seropositive Igel war adult, männlich und wurde Ende Mai 2016 mit mässigem Allgemein- und Nährzustand, Ektoparasiten-Befall, hochgradiger Kopfschiefhaltung nach rechts, Kreislaufen und Desorientierung ins Tierhospital Zürich gebracht. Das Röntgen in zwei Ebenen zeigte eine geheilte Fraktur des rechten Jochbogens und mögliche Anzeichen für eine Mittelohrerkrankung durch eine im Seitenvergleich schlechter definierte *Bulla tympanica* rechts. Zudem wurde eine Knochenneubildung ventral der lumbalen Bandscheiben diagnostiziert. Von den übrigen 64 Igeln sind sieben akut verstorben, bevor genauere Untersuchungen eingeleitet werden konnten, 45 Tiere wiesen innere oder äussere Verletzungen auf, sieben Tiere zeigten Symptome durch starken Parasitenbefall und vier zeigten unspezifische Symptome, die nicht weiter abgeklärt wurden. Ein Igel war klinisch unauffällig und konnte nach der Blutentnahme wieder entlassen werden. Pathologische Untersuchungen wurden nicht durchgeführt.

Die gefundenen Zeckenarten und -stadien sind in Abbildung 1 dargestellt. Mit 104 Individuen wurde die „Igelzecke“ (*I. hexagonus*) weitaus am häufigsten nachgewiesen. Eine Zecke konnte aufgrund des fehlenden Capitulum und somit wichtigen Identifizierungsmerkmalen nicht sicher einer Art zugeordnet werden.

Lunge und Milz des seropositiven Igels wurden wiederholt in zwei verschiedenen Extraktionen sowie deren jeweiligen PCR-Durchläufen positiv auf FSME-Virusantigen getestet mit CT-Werten im Bereich von 34–38.

Mit der nested RT-PCR konnte aus diesen Proben keine Sequenzierung erzielt werden, weshalb zusätzlich ein NGS zum Einsatz kam. Das Vorhandensein des FSMEV konnte mit dieser Methode erfolgreich in beiden Organen bestätigt werden, wobei aufgrund der gepoolten Untersuchung von Lunge und Milz nicht gesagt werden kann, von welchem Organ die einzelnen Reads genau stammen. Das NGS lieferte 14,8 Mio. Reads, von denen 7 auf das TBEV-Referenzgenom (NC_001672) passten. Die Contigs umfassten insgesamt 795 Nukleotide (7% des Genoms) in 4 Fragmenten, die Teile der NS3- und NS5-Proteine bedeckten. Die 7 Reads zeigten 97% Identität mit der Referenzsequenz. Die BLAST-Analyse der Contigs ergab eine 99–100%-ige Identität mit anderen TBEV-Stämmen des europäischen Subtyps aus Schweden, Russland und Ungarn.

Eine zusätzliche Infektion des Igels mit einem Paramyxovirus konnte in Japan ausgeschlossen werden. Alle anderen Organproben waren negativ.

Des Weiteren wurden die 114 Zecken gleichermassen wie oben beschrieben mit der kommerziellen real-time RT-PCR untersucht. Bei keiner der Zecken konnte das Virus nachgewiesen werden, auch nicht bei den fünf Zecken des seropositiven Igels.

Diskussion

In einer der 19 Serumproben wurden im ELISA FSMEV-spezifische Antikörper nachgewiesen. Dies ist nach Kenntnisstand der Autoren der erste Nachweis im europäischen Igel (*E. europaeus*). Als zusätzliche Bestätigung des positiven ELISA-Resultats wäre ein Serumneutralisationstest geeignet gewesen. Da aber von diesem Igel nur sehr wenig Serum gewonnen werden konnte, reichte das Volumen dafür nicht aus. Die Ergebnisse im ELISA waren jedoch reproduzierbar und die Resultate können als einwandfrei erachtet werden. In der Dissertation von Skuballa (2011), die Igel in West- und Mitteleuropa untersucht hat, konnten in keinem der 90 Igelseren Antikörper nachgewiesen werden. Dabei wurde mit dem identischen Testsystem wie in der vorliegenden Studie gearbeitet. Aufgrund der Resultate wurde die Zuverlässigkeit der Methode angezweifelt³⁰. Der verwendete ELISA ist allerdings explizit ein «all species» Test und dank der Verwendung von Protein G unabhängig von Art-spezifischen Detektionsantikörpern. Wie effizient dabei das Protein G Igel-IgG binden kann, ist bisher nicht bekannt. Obwohl in der Testinstruktion des Kits ausschliesslich von der Verwendung von Serumproben die Rede ist, kann Plasma erfahrungsgemäss bei den meisten ELISAs (sofern nicht ausdrücklich ausgeschlossen) gleichwertig wie Serum eingesetzt werden. Dies wurde zum Beispiel für Anti-Tb ELISAs gezeigt²⁹. Auch

Tabelle 1: Nachweis von Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) bei 65 europäischen Igeln (*Erinaceus europaeus*). Übersicht über verwendete Proben und Resultate der vorliegenden Studie.

	Organe*	Serum/ Plasmaproben	Zecken
Anzahl Proben	224 (von 56 Igeln)	19 (von 19 Igeln)	114 (von 34 Igeln)
FSME RNA-Nachweise	2	–	0
FSME Antikörper-Nachweise	–	1	–

* Organe: Lunge, Leber, Milz und Niere

für andere All-Species ELISAs, welche auf Protein-G Konjugat basieren, wie zum Beispiel der biphasische BVDV ELISA, kann problemlos Plasma verwendet werden⁴. Die Autoren gehen davon aus, dass dies auch für den FSME-ELISA der Fall ist. Im Blut des nördlichen Weissbrustigels (*E. roumanicus*) konnten in der Vergangenheit bereits FSMEV-Antikörper nachgewiesen werden¹¹. Auch bei kleinen Wildsäugetieren (Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*), Waldmaus (*A. sylvaticus*) und Rötelmaus (*Myodes glareolus*)) wurden Antikörper gegen das FSMEV in der Schweiz nachgewiesen. Dabei wurde eine FSMEV-Antikörper-Prävalenz von 3.6% berechnet³.

In der Milz und Lunge des seropositiven Igels konnte FSMEV-RNA nachgewiesen werden, während die Proben der Niere und Leber des gleichen Igels negativ ausfielen. Alle anderen Igel der Studie waren Virus-negativ. Für den Nachweis wurde eine kommerzielle real-time RT-PCR verwendet. Die zusätzliche nested RT-PCR erbrachte kein Sequenzierungsergebnis, obwohl die Funktionalität der Methode mit Kontrollproben erfolgreich getestet und eine Positivkontrolle erfolgreich sequenziert wurde. Trotz wiederholten Versuchen konnte der Virusstamm aus der positiven Milz und Lunge nicht sequenziert werden, was wahrscheinlich auf die geringe RNA-Konzentrationen in den Organen zurückzuführen ist (relativ hohe CT-Werte in real-time RT-PCR). Es wurde auch für andere Virusinfektionen gezeigt, dass bei Proben mit CT-Werten über 30 die Sequenzierung oft nicht gelingt⁵.

Mit dem NGS-Verfahren konnte aber der FSMEV-Nachweis in einem Homogenat aus Milz und Lunge belegt werden. Die einzelnen Reads sind zwar sehr kurz (150–240 Nukleotide), umfassten aber insgesamt 795 Nukleotide und damit immerhin 7% des Genoms und zeigten sich bei der online Analyse mittels BLAST® fast identisch (99–100%) mit Sequenzen von publizierten FSMEV-Stämmen des Europäischen Subtyps aus Russland, Schweden und der Slowakei.

Der gleichzeitige Nachweis von FSMEV-RNA und -Antikörpern beim untersuchten Tier in der vorliegenden Studie gibt Hinweise, dass es sich um eine länger anhaltende Persistenz des Virus handeln könnte. Bei experimenteller Infektion konnten bei Gelbhalsmäusen (*A. flavicollis*) erst am 13. Tag und bei Rehen (*Capreolus capreolus*) und Füchsen (*Vulpes vulpes*) am 8. Tag nach der Infektion neutralisierende Antikörper festgestellt werden²³. Tonteri *et al.* (2011) nehmen an, dass es zu latenten Infektionen in Wirtstieren kommen kann, da einige Monate nach der Zeckensaison noch immer FSMEV-RNA in den inneren Organen und des Hirns von Nagern nachgewiesen werden konnten³¹. Diese Viruspersistenz in latent infizierten Tieren könnte das

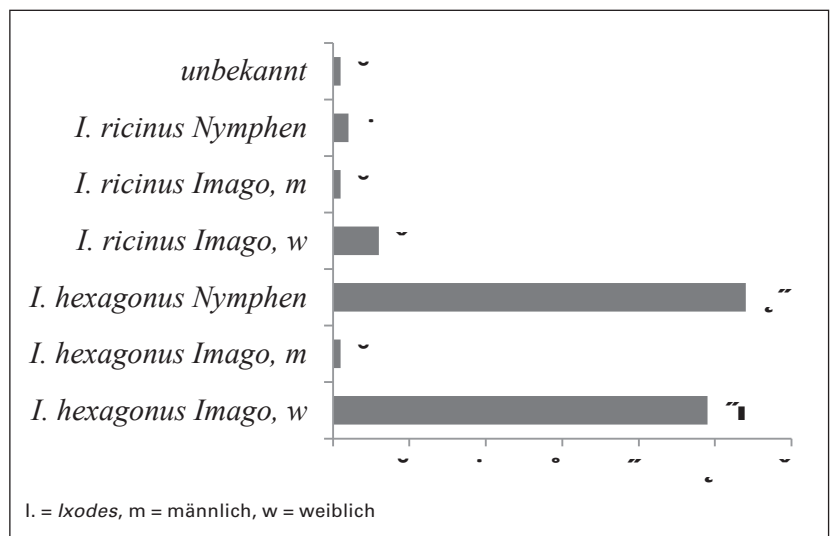


Abbildung 1: Verteilung der Zeckenarten und -stadien von 114 untersuchten Zecken, gesammelt im Rahmen der vorliegenden Studie von 34 europäischen Igeln (*Erinaceus europaeus*).

Überleben des Virus während der Wintermonate in endemischen Gebieten sicherstellen⁶.

Der Zeitpunkt der Virämie des positiv getesteten Igels in der vorliegenden Studie deckt sich mit Studien von Skuballa (2011) und Kozuch *et al.* (1967), bei denen bei insgesamt drei Igeln (einem europäischen und zwei nördlichen Weissbrustigeln) ebenfalls Ende Mai FSMEV isoliert werden konnte^{11,30}. In der Schweiz beginnt die Zeckensaison je nach Witterung im März und endet im November²⁸. Der Fundort des positiven Igels ist auf Abbildung 2 als roter Punkt dargestellt. Wie in der Abbil-

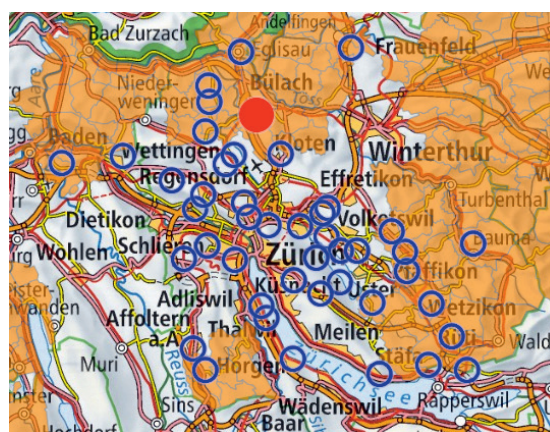


Abbildung 2: Fundorte der untersuchten Igel (ausgenommen ein Igel aus Detligen, Radelfingen, BE) und Visualisierung der lokalen Häufung der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) in dieser Region. Roter Punkt: positiv auf FSME getesteter Igel. Blaue Kreise: negativ auf FSME getestete Igel. Orange: Regionen lokaler Häufungen der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME), basierend auf Daten des obligatorischen Meldesystems der Jahre 2007–2016 der Schweizerischen Eidgenossenschaft. Datenstand: 31.12.2016. Erstellt auf <https://map.geo.admin.ch>

Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus Nachweis beim Europäischen Igel (*Erinaceus europaeus*)

K. Schönbachler et al.

dung ersichtlich, liegt der Fundort Bülach inmitten eines Gebietes mit lokaler Häufung der humanen Erkrankung FSME²⁶.

Über symptomatische FSMEV-Infektionen beim Igel ist bisher nichts bekannt. Bei experimentellen Infektionen von Gelbhalsmäusen, Füchsen und einem Rehkitz mit dem FSMEV konnten bei keinem Versuchstier Krankheitssymptome beobachtet werden²³. Auch domestizierte Tiere entwickeln trotz Infektion meist keine Symptome¹⁷. Der Igel der vorliegenden Studie zeigte Kopfschiefhaltung, Kreislaufen und Desorientierung, welche auf eine akute Meningoenzephalitis hinweisen könnten. Differentialdiagnostisch konnten allerdings weitere mögliche Ursachen wie andere Infektionen des Zentralnervensystems, Schädelhirntrauma, Otitis, Vergiftung oder eine systemische Infektion nicht ausgeschlossen werden. In der Literatur ist ferner der Zusammenhang von neurologischen Symptomen bei einem Igel mit einem Mäuse-Pneumovirus, einem Paramyxovirus, beschrieben. Es handelte sich bei dem Fall um einen afrikanischen Igel (*Atelerix arbiventris*) mit vermutetem wobbly hedgehog syndrome¹⁶. Ähnliche Symptome mit Ataxie, Parese und Paraplegie wurden auch schon bei europäischen Igeln beobachtet und in einem Fall konnte sogar ein Paramyxovirus isoliert werden^{20,32}. Aus diesen Gründen wurden in dieser Studie Igel mit verdächtigen Symptomen zusätzlich auf das Mäuse-Pneumovirus abgeklärt. Eine weitere diagnostische Aufarbeitung wie die Histopathologie des Hirns und weitere Tests auf virale oder bakterielle Infektionen des FSMEV-positiven Igels hätten möglicherweise mehr Aufschluss über die tatsächliche Pathogenese der Symptomatik gegeben.

Mit einer von Rieille *et al.* (2014) beschriebenen FSMEV-Prävalenz in der Schweiz von 0.16% bis zu 11.11% in der Zeckenart *I. ricinus* ist es nicht überraschend, dass in den nur neun untersuchten *I. ricinus* der vorliegenden Studie kein Virus nachgewiesen werden konnte²⁵. In einer kürzlich erschienenen Studie mit über tausend *I. ricinus* Zecken aus Stadtgebieten der Schweiz wurden keine FSMEV-positiven gefunden¹⁹. Auch keine der „Igelzecken“ (*I. hexagonus*) aus der vorliegenden Studie wurde positiv auf das FSMEV getestet. Die Bedeutung des Igels und seiner häufigsten Zecke *I. hexagonus* als Überträger des FSMEV wurde aber in verschiedenen Publikationen diskutiert^{10,18}. Die Prävalenz des FSMEV in der *I. hexagonus* wurde jedoch bisher nicht genauer untersucht, eine Übertragung von Erregern von *I. ricinus*

auf *I. hexagonus* und umgekehrt scheint aber bei einer Blutmahlzeit an einem gemeinsamen Wirt prinzipiell möglich⁸.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der europäische Igel (*E. europaeus*) in der Schweiz mit dem FSMEV infiziert sein kann und dessen Antikörper mit einem herkömmlichen ELISA nachgewiesen werden können. Der Virusnachweis ist mittels einer sensitiven real-time RT-PCR in verschiedenen Organen möglich. Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Studie kann der europäische Igel als Wirt des FSMEV angesehen werden und eine Reservoirkompetenz kann vermutet werden. Da nur ein einziger Igel positiv auf das FSMEV getestet wurde und in keiner der Zecken ein Nachweis erfolgte, kann keine Aussage über die Prävalenz des FSMEV in dieser Tierart gemacht werden. Da in dieser Studie neben der Igelzecke (*I. hexagonus*) auch die Zeckenart *I. ricinus* gefunden wurde, die vornehmlich den Menschen befällt, können wir davon ausgehen, dass sich der Mensch über diese durchaus anstecken könnte. Dabei soll noch einmal erwähnt sein, dass sich fast alle Igel und somit auch ihre Zecken während ihres Fundzeitpunktes in einem Hochrisikogebiet der FSME befanden. Das zoonotische Potential kann aber etwas relativiert werden, da über 90% der Zecken in dieser Studie der Art *I. hexagonus* zugeordnet werden konnten und für diese Art laut einer Studie von Arthur (1952) der Mensch lediglich ein akzidenteller Wirt darstellt². Demnach scheint das Ansteckungsrisiko für den Menschen über eine vom Igel infizierte Zecke vermutlich sehr klein zu sein obwohl grundsätzlich möglich.

Die Möglichkeit einer durch die Virusinfektion ausgelösten Enzephalitis im Igel kann mit dieser Studie weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Die weitere Erforschung der Bedeutung kleiner Wildsäuger wie dem Igel für die Epidemiologie und Ausbreitung des FSMEV ist wichtig für die effiziente Kontrolle und Prävention dieser sowie anderer von Zecken übertragenen Krankheiten.

Danksagung

Ein besonderer Dank geht an die Haldimann-Stiftung für die finanzielle Unterstützung der Betreuung von Wildtieren. Ein weiterer Dank gilt auch Hiroo Madarame von der Azabu University in Japan für die Abklärung auf den Mäusepneumonie-Virus (Paramyxovirus).

Détection du virus de la méningo-encéphalite verno-estivale chez le hérisson d'Europe (*Erinaceus europaeus*)

En raison du nombre élevé de tiques présents chez les hérissons d'Europe (*Erinaceus europaeus*), ces animaux sont fortement exposés aux différents pathogènes qu'ils transmettent, pathogènes qui, en plus de l'importance directe pour la santé de l'hôte, peuvent aussi avoir un potentiel en termes de zoonose. La méningo-encéphalite à tique est, en Suisse, une maladie importante transmise par les tiques. Elle est causée par le virus de la méningo-encéphalite verno-estivale. Son occurrence chez les hérissons d'Europe est jusqu'à maintenant peu connue. Au travers de l'étude des organes, du sang et des tiques provenant de 65 hérissons européens, il devrait pour la première fois être possible de se prononcer sur la présence du virus chez cette espèce en Suisse. La détection de l'ARN viral a été effectuée au moyen d'une RT-PCR en temps réel sur les poumons, le foie, la rate et les reins de 56 hérissons ainsi que sur un total de 114 tiques dont ils étaient porteurs, appartenant aux espèces *Ixodes hexagonus* ou *Ixodes ricinus*. En outre, 19 échantillons de sang ont été testés par ELISA pour des anticorps contre le virus. Dans la présente étude, des anticorps contre le virus de l'encéphalite à tiques dans le sérum d'un hérisson européen ont pu être détectés pour la première fois. Les échantillons de poumon et de rate du même animal ont également montré une faible présence virale. Le même hérisson a présenté des symptômes neurologiques, mais ceux-ci pouvaient également être associés à d'autres maladies. On n'a démontré la présence d'ARN viral chez aucune tique. La possibilité d'une encéphalite causée par l'infection virale chez les hérissons ne peut pas être confirmée ou exclue avec cette étude. La détection simultanée des anticorps et de l'ARN viral chez le même animal fait du hérisson européen non seulement un hôte compétent du virus de l'encéphalite verno-estivale mais donne également à penser que cette espèce pourrait servir de réservoir.

Mots-clés: Anticorps, Flavivirus, *Ixodes* spp., Hôte-réservoir, Suisse, hôte

Rilevamento del virus della meningoencefalite trasmessa dalle zecche nel riccio europeo (*Erinaceus europaeus*)

I ricci selvatici europei (*Erinaceus europaeus*), a causa dell'elevata infestazione da zecche, hanno un'elevata esposizione a vari agenti patogeni veicolati da queste ultime, che possono avere oltre a un'importanza diretta per la salute dell'ospite, un potenziale zoonotico. In Svizzera, la meningoencefalite trasmessa dalle zecche è una grave patologia causata dal virus della meningoencefalite. Poco si sa della sua presenza nel riccio europeo. Per la prima volta grazie all'esame degli organi, del sangue e delle zecche di 65 ricci europei è stata dichiarata la presenza del virus in questa specie in Svizzera. Il RNA virale è stato rilevato con il real-time PCR da polmoni, fegato, milza e reni di 56 ricci e su un totale di 114 zecche infestanti, appartenenti alle specie *Ixodes hexagonus* o *Ixodes ricinus*. Inoltre, 19 campioni di sangue sono stati analizzati con ELISA per la ricerca di anticorpi contro il virus. Nel presente studio e per la prima volta, gli anticorpi contro il virus della meningoencefalite veicolata da zecche sono stati rilevati nel siero sanguigno di un riccio europeo. Anche i campioni di polmoni e milza dello stesso animale risultavano debolmente positivi al virus. Il riccio stesso mostrava sintomi neurologici che, tuttavia, potrebbero provenire da altre malattie. Nessun RNA virale è stato rilevato nelle zecche. La possibilità di encefalite nei ricci causata dall'infezione virale non può essere confermata o esclusa da questo studio. La simultanea individuazione di anticorpi e RNA virale nello stesso animale non solo rende il riccio europeo un ospite competente del virus della meningoencefalite, ma dà anche motivo di credere che questa specie possa fungere da serbatoio.

Parole chiavi: Anticorpi, Flavivirus, *Ixodes* spp., ospite serbatoio, Svizzera, ospite

Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus Nachweis beim Europäischen Igel (*Erinaceus europaeus*)

K. Schönbachler et al.

Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus Nachweis beim Europäischen Igel (*Erinaceus europaeus*)

K. Schönbachler et al.

Literatur

- ¹ Ackermann M, Engels M, Fraefel C, Laimbacher A, Metzler A, Schwyzer M, Tobler K: Virus-Handbuch für Veterinärmediziner. Haupt, Bern, CH. 2013.
- ² Arthur DR: The host relationships of *Ixodes hexagonus* leach in Britain. *Parasitology* 1953: 43(3-4): 227-238.
- ³ Burri C, Korva M, Bastic V, Knap N, Avsic-Zupanc T, Gern L: Serological Evidence of Tick-Borne Encephalitis Virus Infection in Rodents Captured at Four Sites in Switzerland. *J. Med. Entomol.* 2012: 49(2): 436-439
- ⁴ Canal CW, Strasser M, Hertig C, Masuda A, Peterhans E: Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. *Vet Microbiol* 1998: 63(2-4): 85-97.
- ⁵ Deng YM, Caldwell N, Barr IG: Rapid detection and subtyping of human influenza A viruses and reassortants by pyrosequencing. *PLoS ONE* 2011: 6(8): e23400.
- ⁶ Dobler G, Gniel D, Petermann R, Pfeffer M: Epidemiology and distribution of tick-borne encephalitis. *Wien. Med. Wochenschr.* 2012: 162(11-12): 230-238.
- ⁷ Estrada-Peña A, Bouattour A, Camicas JL, Walker AR: Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region. University of Zaragoza, Zaragoza, ESP. 2004.
- ⁸ Harrison A, Bennett NC: The importance of the aggregation of ticks on small mammal hosts for the establishment and persistence of tick-borne pathogens: an investigation using the R-0 model. *Parasitol.* 2012: 139(12): 1605-1613.
- ⁹ Hillyard PD: Ticks of North-West Europe. Field Studies Council, Montford Bridge, U.K. 1996.
- ¹⁰ Jemersic L, Dezdek D, Brnic D, Prpic J, Janicki Z, Keros T, Roic B, Slavica A, Terzic S, Konjevic D, Beck R: Detection and genetic characterization of tick-borne encephalitis virus (TBEV) derived from ticks removed from red foxes (*Vulpes vulpes*) and isolated from spleen samples of red deer (*Cervus elaphus*) in Croatia. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014: 5: 7-13.
- ¹¹ Kozuch O, Gresikova M, Nosek J, Lichard M, Sekeyova M: The Role of Small Rodents and Hedgehogs in a Natural Focus of Tick-borne Encephalitis. *Bull. World Health Organ.* 1967: 36: 61-66.
- ¹² Kozuch O, Nosek J: Alimentary Infection of the Hedgehog with Tick-Borne Encephalitis (TE) Virus. *Acta. Virol.* 1964: 8: 284.
- ¹³ Krivanec K, Kopecky J, Tomkova E, Grubhoffer L: Isolation of TBE Virus from the Tick *Ixodes-Hexagonus*. *Folia Parasitol.* 1988: 35(3): 273-276.
- ¹⁴ Kubacki J, Fraefel C, Jermini M, Giannini P, Martinetti G, Ripellino P, Bernasconi E, Sidler X, Stephan R, Bachofen C: Complete Genome Sequences of Two Swiss Hepatitis E Virus Isolates from Human Stool and Raw Pork Sausage. *Genome Announc.* 2017: 5(35): e00888-17.
- ¹⁵ Labuda M, Nuttall PA, Kozuch O, Eleckova E, Williams T, Zuffova E, Sabo A: Non-viraemic transmission of tick-borne encephalitis virus: a mechanism for arbovirus survival in nature. *Experientia* 1993: 49(9): 802-805.
- ¹⁶ Madarame H, Ogihara K, Kimura M, Nagai M, Omatsu T, Ochiai H, Mizutani T: Detection of a pneumonia virus of mice (PVM) in an African hedgehog (*Atelerix arbibventris*) with suspected wobbly hedgehog syndrome (WHS). *Vet. Microbiol.* 2014: 173(1-2): 136-140.
- ¹⁷ Mansfield KL, Johnson N, Phipps LP, Stephenson JR, Fooks AR, Solomon T: Tick-borne encephalitis virus—a review of an emerging zoonosis. *J. Gen. Virol.* 2009: 90: 1781-1794.
- ¹⁸ Nosek J, Grulich I: The relationship between the tick-borne encephalitis virus and the ticks and mammals of the Tribec mountain range. *Bull. World Health Organ.* 1967: 36: 31-47.
- ¹⁹ Oechslin CP, Heutschi D, Lenz N, Tischhauser W, Peter O, Rais O, Beuret CM, Leib SL, Bankoul S, Ackermann-Gäumann R: Prevalence of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks in urban and suburban areas of Switzerland. *Parasit. Vectors* 2017: 10(1): 558.
- ²⁰ Palmer AC, Blakemore W, Franklin RJM, Frost LM, Gough RE, Lewis JCM, MacDougall DF, O'Leary MT, Stocker LR: Paralysis in hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) associated with demyelination. *Vet. Rec.* 1998: 143(20): 550-552.
- ²¹ Puchhammer-Stöckl E, Kunz C, Mandl CW, Heinz FX: Identification of tick-borne encephalitis virus ribonucleic acid in tick suspensions and in clinical specimens by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay. *Clin. Diagn. Virol.* 1995: 4(4): 321-326.
- ²² Radda A: Die Zeckenzephalitis in Europa. Geographische Verbreitung und Ökologie des Virus. *Z. angew. Zool.* 1973: 60: 409-461.
- ²³ Radda A, Hofmann H, Kunz C: Experimentelle Infektion einiger heimischer Säugerarten mit dem Frühsommer-Meningo-Enzephalitis (FSME)-Virus. *Zentralbl. Bakteriolog. Orig.* 1968: 208(1): 100-104.
- ²⁴ Randolph SE: Transmission of tick-borne pathogens between co-feeding ticks: Milan Labuda's enduring paradigm. *Ticks Tick Borne Dis.* 2011: (4): 179-182.
- ²⁵ Rieille N, Bressanelli S, Freire CCM, Arcioni S, Gern L, Peter O, Voordouw MJ: Prevalence and phylogenetic analysis of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in field-collected ticks (*Ixodes ricinus*) in southern Switzerland. *Parasite Vector* 2014: 7: 443.
- ²⁶ Schweizerische Eidgenossenschaft: Karten der Schweiz, FSME - lokale Häufungen. Bundesamt für Gesundheit BAG, Bern, CH: <https://map.geo.admin.ch/>. (accessed 21.05.2018)
- ²⁷ Schweizerische Eidgenossenschaft: Zahlen zu Infektionskrankheiten. Bundesamt für Gesundheit BAG, Bern, CH: <https://www.bag.admin.ch/bag/de/home/service/zahlen-fakten/zahlen-zu-infektionskrankheiten.exturl.html>. (accessed 21.05.2018)
- ²⁸ Schweizerische Eidgenossenschaft: Zeckenübertragene Krankheiten - Lagebericht Schweiz. Bundesamt für Gesundheit BAG Bern, CH: <https://www.bag.admin.ch/bag/de/home/themen/mensch-gesundheit/uebertragbare-krankheiten/ausbrueche-epidemien-pandemien/aktuelle-ausbrueche-epidemien/zeckenuebertragene-krankheiten.html>. (accessed 21.05.2018)
- ²⁹ Siev M, Yu X, Prados-Rosales R, Martiniuk FT, Casadevall A, Achkar JM: Correlation between serum and plasma antibody titers to mycobacterial antigens. *Clin Vaccine Immunol* 2011: 18(1): 173-175.
- ³⁰ Skuballa JD: Die Rolle des Europäischen Igels (*Erinaceus europaeus*) in der Epidemiologie zeckenübertragener Krankheiten. Dissertation/Habilitation: Karlsruher Institut für Technologie, 2011.
- ³¹ Tonteri E, Jaaskelainen AE, Tikkakoski T, Voutilainen L, Niemimaa J, Henttonen H, Vaheri A, Vapalahti O: Tick-borne encephalitis virus in wild rodents in winter, Finland, 2008-2009. *Emerg. Infect. Dis.* 2011: 17(1): 72-75.

³² Vizoso AD, Thomas WE: Paramyxoviruses of the Morbilli Group in the Wild Hedgehog *Erinaceus-Europeus*. Br. J. Exp. Pathol. 1981; 62(1): 79-86.

Korrespondenzadresse

Katja Schönbachler
Altwiesenstr. 220
8051 Zürich
E-Mail: katja.schoenbaechler@uzh.ch

Frühsommer-Meningoen-
zephalitis-Virus Nachweis
beim Europäischen Igel
(*Erinaceus europaeus*)

K. Schönbachler et al.